

学校编码: 10384

分类号

密级

学号: 24520111153425

UDC

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

PLC- γ 1 调节人胃腺癌迁移的机制研究

The role and regulatory mechanism of PLC- γ 1 in
metastasis of human gastric adenocarcinoma

庄鹭花

指导教师姓名: 张 兵

专 业 名 称: 生 理 学

论文提交日期: 2014 年 5 月

论文答辩时间: 2014 年 5 月

学位授予日期: 年 月

答辩委员会主席:

评 阅 人:

2014 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

肿瘤转移是指肿瘤细胞从原发部位通过淋巴道、血管或体腔等途径转移到其他部位继续生长的过程。胃癌是世界上发病率最高的恶性肿瘤之一，其较高死亡率与肿瘤细胞的转移密切相关。阻断迁移、侵袭等肿瘤转移的基本步骤对肿瘤治疗至关重要。近年来分子靶向治疗因其针对性强、对正常细胞损伤小而成为治疗恶性肿瘤的优先选择。深入探讨信号分子在肿瘤转移中作用机制可为筛选治疗肿瘤的有效分子靶点提供依据。

PLC- γ 1 (phosphoinositide-specific phospholipase- γ 1) 在肿瘤迁移中有着重要的作用，激活的 PLC- γ 1 水解磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸 (phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate, PIP2)，生成第二信使肌醇 1,4,5-三磷酸 (inositol 1,4,5-triphosphate, IP3) 和甘油二酯 (diacylglycerol, DAG)，继而诱导钙离子的释放，激活 PKC，最终影响细胞的生长、凋亡、侵袭、转移等多个生物学行为。本文以体外培养的人胃癌细胞系 BGC823 与 SGC7901 以及部分临床标本为研究对象，探讨了 PLC- γ 1 在胃癌细胞中调控肿瘤迁移的作用，并进一步阐明了其在迁移作用中的分子机制。

首先采用免疫组化和 western blotting 的方法，统计分析正常人胃黏膜组织及胃腺癌组织中 PLC- γ 1 蛋白表达。结果显示：PLC- γ 1 在胃腺癌组织中，尤其是在淋巴结转移的胃腺癌中表达较高。藉此推测 PLC- γ 1 与胃腺癌迁移相关，可能参与了胃腺癌的迁移过程，并在组织芯片中进一步得到验证。

为了探讨 PLC- γ 1 是否具有调控胃腺癌细胞迁移的能力，体外培养胃腺癌细胞系 BGC823 与 SGC7901。经划痕实验，transwell 和鬼笔环肽的方法观察到 PLC- γ 1 的活性的抑制可有效阻断细胞的迁移；同时，western blotting 与 RT-PCR 检测到 PLC- γ 1 的活性被抑制可使 MMP 9 蛋白及 mRNA 表达水平减少；随后，通过相关抑制剂及 RNA 静默技术检测 PLC- γ 1 的两个经典下游信号轴 IP3/Ca²⁺/CaMKII 与 DAG/PKC 均通过调节 ERK/MMP 参与胃腺癌细胞迁移活动。

细胞迁移活动受细胞内复杂的信号网络调控，探讨 PLC- γ 1 与相关信号分子间的关联是深入研究其在迁移过程中的作用机制所必需。已有文献证实的蛋白激酶 B(PKB/Akt)是肿瘤增殖、迁移重要信号分子，并且在非洲猴肾成纤维细胞 (Cos-7) 中观察到 EGF 诱导下 Akt 与 PLC- γ 1 能够相互结合，并影响 PLC- γ 1 的

活性。为此我们在体外培养的 BGC823 胃腺癌细胞内检测了两者的相互关联。结果显示：尽管 PLC- γ 1 与 Akt 之间没有结合，但是两者的抑制剂可交互抑制，即两者间存在一个相互抑制/促进作用。随后观察到过表达的 Akt 可促进 PLC- γ 1 的活性(Y783 与 S1248)提高。然而 PLC 的过表达明显抑制 Akt 的活性，结合以往学者对两种信号分子的激活机制的研究结果，推测两者之间可能存在一个调节环(Loop)：PI3K 可同步激活 Akt 与 PLC- γ 1，并且因为 PLC- γ 1 拥有 Akt 底物序列(S1248)，因此 Akt 可作为上游分子调控 PLC- γ 1；另一方面 PLC- γ 1 表达水平提高可负反馈调节 PI3K、Akt 进而抑制 Akt 的激活。在临床标本中的观察显示，相对于 Akt，PLC- γ 1 在淋巴结转移的胃腺癌中有较高表达，推测 PLC- γ 1 在胃腺癌转移中的作用占优势。

综上所述，本论文的研究结果证实 PLC- γ 1 能够促进胃腺癌细胞的迁移，细胞迁移中迁移率、细胞骨架的重排部分依赖于 PLC- γ 1 的活性。PLC- γ 1 的两个经典下游信号轴 IP3/Ca²⁺/CaMKII 与 DAG/PKC 均通过 ERK/MMP 途径参与胃腺癌细胞迁移调控。在胃腺癌细胞中 Akt 和 PLC- γ 1 之间存在一个调节环(loop)：一方面 Akt 可作为上游分子调控 PLC- γ 1；另一方面过表达 PLC- γ 1 可负反馈调节 PI3K 进而抑制 PI3K 对 Akt 的激活。上述结果初步阐明 PLC- γ 1 在人胃腺癌细胞迁移中的作用及机制，为其成为潜在的治疗胃腺癌的分子靶点提供依据。

关键词：胃腺癌；迁移；PLC - γ 1

Abstract

Tumour metastasis is the process of tumour cells migrating from primary site to other areas by lymphatic vessel, blood vessel or body cavity and continuing to grow in other areas. The incidence rate of gastric cancer is the highest in malignant tumors. Its high mortality is closely related with tumour metastasis. Therefore, the reduction of the mortality of gastric cancer in advanced stages is required for its therapy. Recently, molecular targeted therapy became the first choice in the treatment of malignant tumour because of its higher pertinence and lower damaging to normal cells. The study on the roles of signal molecules in tumour metastasis could then provided the theoretical foundation for screening effective molecular targets for cancer treatment.

Phosphoinositide-specific phospholipase- γ 1 (PLC- γ 1) plays an important role in tumour metastasis. It could be activated by platelet derived growth factor (PDGF), epidermal growth factor (EGF) and (FGF) through a phosphorylation mechanism. The activation mobilizes internal calcium stores and engages multiple protein kinase pathways that control or modulate cell division, transformation, differentiation, shape, motility, and apoptosis. In this study, the role of PLC- γ 1 in regulating the metastasis of gastric cancer cells was investigated in human gastric adenocarcinoma cell lines BGC823 and SGC7901 and clinical specimens.

First of all, we analyzed fresh human gastric adenocarcinoma tissues, human normal gastric mucosa tissues, and tissue assay by western blotting and immunohistochemistry. The result displayed that PLC- γ 1 expression was higher in human gastric adenocarcinoma tissues specifically in advanced gastric adenocarcinoma tissues Which indicating the involvement of PLC- γ 1 in the metastasis of gastric adenocarcinoma. In order to explore the regulatory mechanism of PLC- γ 1 in the metastasis of gastric adenocarcinoma. Gastric cancer cells, BGC823 and SGC7901 were treated by the PLC- γ 1 inhibitor-U73122 or sh-PLC- γ 1, followed by the detections of cell migration, such as Wound healing and Transwell and Ruffling assay western blotting. At the same time, the expression levels of MMP9

protein and mRNA were monitored by RT-PCR and Western blotting. The results indicated that the migration of gastric adenocarcinoma cells partly depended on PLC- γ 1 activity.

In addition, the roles of IP3/Ca²⁺/CaMKII and DAG/PKC of PLC- γ 1 were investigated in BGC823 cells which were treated with different inhibitors CaMKII or DAG or shRNA. The results indicated that the two classical signal axes, IP3/Ca²⁺/CaMKII and DAG/PKC, activated ERK and up-regulated MMP9 expression.

Previous studies showed that Akt binded to and phosphorylated PLC- γ 1 in response to EGF in cos-7 cell line. Here, we found that although Akt couldn't bind to PLC- γ 1 in BGC823 cells, the reciprocal inhibition/stimulation was observed by the treatment of their inhibitors, U73122 and TCN or si-PLC- γ 1 and si-Akt. Furthermore, the overexpression of Akt increased the expression and activity of PLC- γ 1. However, the overexpression of PLC- γ 1 inhibited the activity of Akt. Combined with other authors' study on the regulatory mechanisms of PLC- γ 1 and Akt in other cancer cells, we inferred that there is a loop between PLC- γ 1 and Akt: on one hand, PI3K could activate Akt and PLC simultaneously, while Akt might serve as an upstream to regulate PLC- γ 1 because of the substrate sequence(S1248)in PLC- γ 1; on the other hand, the overexpression of PLC- γ 1 could negatively feedback on PI3K or Akt, leading to the inhibition of Akt activity. The result of immunochemistry in clinical specimens showed that PLC- γ 1 had a higher expression than Akt in lymph node metastasis of gastric carcinoma, indicating the predominance of PLC- γ 1 on cell migration of gastric adenocarcinoma.

In conclusion, it was demonstrated that PLC- γ 1 was related to the dissemination of gastric adenocarcinoma. The cell migration with actin cytoskeleton reorganization partly depended on PLC- γ 1 activation in gastric adenocarcinoma cell line. Both of the classical downstream pathway IP3/Ca²⁺/CaMKII and DAG/PKC regulates cell migration by ERK/MMP9. Furthermore, there is a loop between PLC- γ 1 and Akt: on one hand, PI3K could activate Akt and PLC simultaneously, while Akt might serve as an upstream to regulate PLC- γ 1 because of the substrate

sequence(S1248)in PLC- γ 1; on the other hand, the overexpression of PLC- γ 1 could negatively feedback on PI3K or Akt, leading to the inhibition of Akt activity. The role of the loop between PI3K or Akt in cell migration of gastric adenocarcinoma is further studied. The data suggest that PLC- γ 1 may serve as one of targets for treatment of gastric adenocarcinoma.

Key Words: Gastric carcinoma; Migration; PLC- γ 1

目 录

中文摘要	I
英文摘要	III
第 1 章 引言.....	1
1.1 肿瘤的迁移特性	2
1.1.1 肿瘤迁移机制.....	2
1.1.2 胃癌的临床分期及其意义.....	3
1.2 PLC- γ 1.....	4
1.2.1 PLC- γ 1 的分子结构	4
1.2.2 PLC- γ 1 的活性机制	5
1.2.3 PLC- γ 1 的生物学功能	6
1.3 PLC- γ 1 在肿瘤发生发展中的作用	7
1.3.1 PLC- γ 1 参与肿瘤的凋亡	7
1.3.2 PLC- γ 1 诱导肿瘤的增殖	7
1.3.3 PLC- γ 1 促进肿瘤的迁移、侵袭	7
1.4 本课题研究目标、内容与意义.....	8
第 2 章 实验材料与方法.....	10
2.1 实验材料.....	10
2.1.1 细胞系、质粒.....	10
2.1.2 工具酶和抗体.....	10
2.1.3 主要化学试剂和耗材.....	11
2.1.4 细胞培养试剂.....	12
2.1.5 主要仪器.....	12
2.1.6 主要溶液配制.....	13
2.2 实验方法.....	16
2.2.1 细胞培养.....	16
2.2.2 划痕实验.....	17
2.2.3 罗丹明-鬼笔环肽	17
2.2.4 脂质体转染.....	18
2.2.5 总蛋白浓度测定(BCA 法).....	18
2.2.6 Western Blot 检测蛋白表达.....	19
2.2.7 质粒的中量提取.....	21
2.2.8 Transwell.....	22

2.2.9 慢病毒包装与感染.....	22
2.2.10 Realtime-PCR 法	23
2.2.11 免疫组化.....	24
2.2.12 组织样本.....	24
2.2.13 点突变.....	25
2.2.14 数据处理.....	26
第 3 章 实验结果	27
3.1 PLC- γ 1 在人胃腺癌中的表达	27
3.1.1 PLC- γ 1 在不同临床分期的人胃腺癌中的表达水平	27
3.2 PLC- γ 1 参与人胃腺癌细胞的迁移活动调节.....	28
3.2.1 PLC- γ 1 调控人胃腺癌的迁移	28
3.2.2 PLC- γ 1 调控人胃腺癌细胞骨架	31
3.3 DAG/PKC 和 IP3/CaMK II 信号轴在胃腺癌细胞迁移中的作用	32
3.3.1 DAG/PKC 和 IP3/CaMK II 信号轴调控胃腺癌细胞迁移	32
3.3.2 PLC- γ 1 及其下游 DAG/PKC 和 IP3/CaMK II 信号轴通过 ERK/ MMP9 调控胃腺癌细胞迁移.....	34
3.3.3 PLC- γ 1 及其下游 PKC δ 和 CaMK II β 对 MMP9mRNA 水平的影响...35	
3.4 人胃腺癌细胞内 Akt 与 PLC- γ 1 的相互关联	37
3.4.1 PLC- γ 1 和 Akt 在淋巴结转移的胃腺癌中的表达	37
3.4.2 在人胃腺癌细胞中 Akt 对 PLC- γ 1 的调控	38
3.4.3 在人胃腺癌细胞中 PLC- γ 1 对 Akt 的调控	40
第 4 章 讨论.....	42
4.1 PLC- γ 1 促进人胃腺癌细胞的迁移.....	43
4.2 PLC- γ 1 及其下游 DAG/PKC 和 IP3/CaMK II 通过 ERK/ MMP9 调控细胞迁移	43
4.3 人胃腺癌细胞内 Akt 与 PLC- γ 1 的相互关联	45
第 5 章 结论.....	47
参考文献	48
致 谢.....	56

Table of Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English.....	III
Chapter I Preface	1
1.1 Tumour-cell migration feature	2
1.1.1 The migration mechanisms of tumour	2
1.1.2 The clinical stage and significance in gastric cancer	3
1.2 PLC-γ1.....	4
1.2.1 The structure of PLC- γ 1	4
1.2.2 The activity mechanism of PLC- γ 1	5
1.2.3 The biological function of PLC- γ 1	6
1.3 The role of PLC-γ1 in tumorigenesis and development	7
1.3.1 PLC- γ 1 involves in tumour apoptosis.....	7
1.3.2 PLC- γ 1 induces tumour proliferation	7
1.3.3 PLC- γ 1 promotes tumour migration and invasion.....	7
1.4 Aims, contents and significance of the projects.....	8
Chapter II Materials and methods	10
2.1 Materials	10
2.1.1 Cell lines, plasmit.....	10
2.1.2 Enzymes and antibodies.....	10
2.1.3 Chemical reagents	11
2.1.4 Reagents for cell culture	12
2.1.5 Equipments	12
2.1.6 Buffers.....	13
2.2 Methods.....	16
2.2.1 Cell culture.....	16
2.2.2 Wound healing assay	17
2.2.3 Rhodamine-phalloidine.....	17
2.2.4 Transfection (Lipofect AMINE 2000 reagent).....	18
2.2.5 Protein concentration determination(BCA)	18
2.2.6 Western Blotting.....	19
2.2.7 Plasmid extraction.....	21
2.2.8 Transwell.....	22
2.2.9 Lentivirus packaging and infection.....	22
2.2.10 Realtime-PCR 法	23

2.2.11 Immunohistochemistry staining	24
2.2.12 Tissue specimens.....	24
2.2.13 Point mutation.....	25
2.2.14 Data analysis	26
Chapter III Results.....	27
3.1 The expression of PLC-γ1 in gastric adenocarcinoma tissues.....	27
3.1.1 The expression of PLC- γ 1 in different clinical stage gastric adenocarcinoma tissues	27
3.2 PLC-γ1 involves in cell migration in human gastric adenocarcinoma	28
3.2.1 PLC- γ 1 promote cell migration in gastric adenocarcinoma.....	28
3.2.2 PLC- γ 1 induces the changes of cytoskeleton in gastric adenocarcinoma cells	31
3.3 The role of downstream pathway DAG/PKC and IP3/CaMK II in tumour cell migration.....	32
3.3.1 DAG/PKC and IP3/CaMK II pathway regulates cell migration in human gastric adenocarcinoma.....	32
3.3.2 DAG/PKC and IP3/CaMK II pathway regulates cell migration by ERK/ MMP9 pathway in human gastric adenocarcinoma.....	34
3.3.3 The effection of PLC- γ 1 and downstream pathway DAG/PKC and IP3/CaMK II on MMP9 from mRNA level.....	35
3.4 Akt interacts with PLCγ1 in gastric adenocarcinoma	37
3.4.1 The expression of PLC- γ 1 and Akt in gastric adenocarcinoma tissues with lymphnode metastasis	37
3.4.2 Akt regulates the PLC- γ 1 in gastric adenocarcinoma cells.....	38
3.4.3 PLC- γ 1 regulates Akt the in gastric adenocarcinoma cell	40
Chapter IV Discussions.....	42
4.1 PLC-γ1 promotes cell migation in human gastric adenocarcinoma	43
4.2 PLC-γ1 and its downstream pathway DAG/PKC and IP3/CaMK II regulates cell migration by ERK/ MMP9 pathway in human gastri adeno carcinoma.....	43
4.3 Akt interacts with PLC γ 1 in gastric adenocarcinoma	45
Chapter V Conclusions.....	47
References	48
Acknowledgements.....	56

第 1 章 引言

肿瘤 (Tumor) 是机体在各种致癌因素作用下, 局部组织的某一个细胞在基因水平上失去对其生长的正常调控, 导致其克隆性异常增生而形成的异常病变。学界一般将肿瘤分为良性和恶性两大类。恶性肿瘤由于分化不成熟、生长较快, 浸润破坏器官的结构和功能, 并可发生转移, 因而对机体影响严重。恶性肿瘤除可引起良性肿瘤相似的局部压迫和阻塞症状外, 还可有发热、顽固性疼痛, 晚期可出现严重消瘦、乏力、贫血和全身衰竭的状态, 而最终导致病人死亡。局部浸润和远处转移是恶性肿瘤最重要的特点, 并且是恶性肿瘤致人死亡的主要原因。

2008 年全球胃癌新发病例和死亡病例约为 989600 和 738000 例, 其中 70% 以上出现在发展中国家尤以东亚发病率最高^[1]。我国胃癌每 10 万人口的年死亡率为 25.21^[1], 在各种恶性肿瘤中占首位。从病变部位观察, 我国胃癌主要集中于胃窦和胃体, 胃食管结合部癌呈现逐渐增多的趋势。从发病年龄分析, 具有年轻化趋势, 年轻人胃癌发病率逐渐上升。从性别来看, 男性患者多于女性患者。从发病特点来看, 我国胃癌患者呈现发病率、转移率、死亡率高; 早诊率、根治性切除率、5 年生存率低的特点^[2]。

大量医学研究充分显示, 胃癌的预后与分期直接相关, 早期胃癌 5 年生存率高达 70% 以上, 而晚期则不足 10%^[3]。手术切除是治疗早期胃癌的最主要手段, 但是因为缺乏特异性的初筛指标以及早期患者症状不明显, 大多数患者在就诊时已经处于进展期, 无法手术切除的进展期胃癌, 患者预后较差, 此时传统的治疗手段对进展期的胃癌的疗效不理想, 这是胃癌患者死亡率高的原因之一。寻求手术等传统治疗以外的方式治疗癌症迫在眉睫。近几十年, 随着分子肿瘤学的快速发展, 许多分子靶向治疗药物应运而生。分子靶向药的高效性和特异性, 为晚期癌症患者带来希望。临床上由 24 个国家, 122 个中心参与了 III 期随机对照实验-ToGA 的研究, 结果显示曲妥珠单抗联合化疗能够显著延长 HER-2 阳性晚期胃癌患者中位生存期至 13.8 个月, 并证实了该治疗的安全性和有效性。^[4] AVAGAST III 期临床试验, 给予化疗药物加上安慰剂组的 OS 为

10.1mo, 化疗药物加上抗 VEGF 单克隆抗体-贝伐单抗组的 OS 为 12.1mo, PFS 延长了 1.4mo^[79]。这些研究结果对于靶向药物治疗胃癌具有重要临床意义。通过对胃癌进行准确临床分期, 能够为制定有效的治疗手段提供基础, 然而由于诊断手段的不足导致治疗过度或不足。因此解开胃癌细胞中与迁移相关的分子机制, 能为我们找到诊断和治疗胃癌的方法提供新思路。全球范围内, 仅有以上两项 III 期临床试验得到初步论证。因此探讨新的分子靶向治疗靶点与机制研究, 为我们今后临床应用提供基础理论。

1.1 肿瘤的迁移特性

1.1.1 肿瘤迁移机制

细胞的迁移是细胞在受到各种外来刺激的作用下, 通过细胞内一系列信号传导、细胞骨架蛋白及分子马达使细胞极化, 不断重复细胞前端的突出、突出与底质黏着、细胞体前移、牵动尾部的过程。这种移动是许多生理过程所必需的, 如创伤恢复、神经嵴细胞的移行。同时也是肿瘤发生过程中重要环节。细胞迁移运动方式决定于其自身状态和微环境。^[5-7]在 2D 培养基上, 细胞的迁移方式主要为个体迁移和群体迁移。在 3D 培养基上, 则主要为间充质迁移和阿米巴迁移。间充质迁移具有整合素依赖的特性, 这种迁移方式需要水解酶的参与以及基质的重组和降解。当基质水解酶被抑制后, 肿瘤细胞可通过挤压自身变形穿过细胞外基质, 即阿米巴迁移, 研究表明, 肿瘤细胞在迁移过程中, 可以在这两种模型中转换, 以适应周围环境的变化, 这大大增强了肿瘤细胞的迁移能力^[8-9]。肿瘤细胞由于骨架发育缺陷和黏附分子表达异常, 导致细胞连结普遍减弱, 细胞与基底黏附失调, 细胞软化, 从而有利于其迁移运动。然而肿瘤细胞的迁移常呈“翻滚”式, 故其迁移效率低于正常细胞, 并由于其位置信息识别能力差, 细胞间的协同性差, 最终导致细胞无序堆积。

肿瘤细胞的迁移是细胞内外环境共同作用的结果, 蛋白和蛋白的相互作用, 信号通路的激活调控了这一过程。首先, 伪足的形成与肌动-肌球蛋白束的装配相关。Rho 是 Rock 和 mdail 的效应器, 低水平的 GTP-Rho 先使 Rho-mdail 活化, 然后激活 Rac, 装配肌动-肌球蛋白束形成板状伪足, 促进以间充质迁移为主的细胞迁移。相反的, 当 Rho-Rock 通路被激活, 装配肌动-肌球蛋白束

形成皮质收缩环，通过磷酸化 Mlc 调控肌球蛋白 2，Mlc2 的磷酸化和 p-Mlc2 的去磷酸化决定肌动-肌球蛋白的收缩活性，促进阿米巴迁移^[10-13]。

伸长的伪足能够通过粘附分子与细胞外基质连接，接着整合素通过受体蛋白与肌动蛋白偶联，富集成团，形成最初的黏着复合物，黏着复合物在数分钟内成长，稳定成为黏着斑，整合素的胞外结构可以募集 MMPS,例如 MMP2, MT1-MMP, MMP1 等，MMPS 能降解 ECM，使胶原纤维重新排列成平行纤维束，单个细胞在此路径上迁移，当单个细胞迁移产生更大的允许群体细胞迁移的管状路径，形成引导式群体迁移^[14-17]。

1.1.2 胃癌的临床分期及其意义

肿瘤分期对临床诊断和治疗极其重要，胃癌也不例外。胃癌分期广泛采用国际抗癌联盟（UICC）和美国癌症联合会（AJCC）制定的 TNM 分期系统。第 7 版 AJCC 胃癌 TNM 分期为 T1：肿瘤侵及黏膜固有层或黏膜下层。T1a：肿瘤侵及黏膜固有层。T1b：肿瘤侵及黏膜下层。T2：肿瘤侵及固有基层。T3：肿瘤侵及浆膜下层（原为 T2b）。T4a：肿瘤侵透浆膜（原为 T3）。T4b：肿瘤侵及邻近器官。N1：1-2 个淋巴结转移。N2：3-6 个淋巴结转移（原为 N1）。N3a：7-15 个淋巴结转移（原为 N2）。N3b： ≥ 16 个淋巴结转移（原为 N3）。Mx 被去除（远处转移不能评估）。cM0：临床无远处转移。cM1：临床有远处转移。PM1：显微镜下证实有远处转移^[18]。

0 期:	Tis	N0	M0
I A 期:	T1	N0	M0
I B 期:	T2	N0	M0
	T1	N1	M0
II A 期:	T3	N0	M0
	T2	N1	M0
	T1	N2	M0
II B 期:	T4a	N0	M0
	T3	N1	M0
	T2	N2	M0
	T1	N3	M0

IIIA 期:	T4a	N1	M0
	T3	N2	M0
	T2	N3	M0
IIIB 期:	T4b	N0	M0
	T4b	N1	M0
	T4a	N2	M0
	T3	N3	M0
IIIC 期:	T4b	N2	M0
	T4b	N3	M0
	T4a	N3	M0
IV 期:	任何 T	任何 N	M1

胃癌的分期与临床治疗手段、预后密切相关。胃癌的治疗手段包括外科手术、化疗、放疗、分子靶向治疗等。治疗前的准确分期有助于手术和综合治疗的合理选择。术后病理分期能够指导选择合理的辅助治疗方案。遗憾的是，临床诊断手段的不足，如超声胃镜的可及性不足等导致对胃癌分期的判断不够精准，可能造成治疗过度或治疗不足，对病人的预后极其不利^[19-20]。随着分子生物学技术的迅速发展，肿瘤标志物成为分子分型的可能或许能够为临床治疗带来更为精细的指导，但目前尚无明确的定论，分子分期的可行性到临床实践还有很长的路要走。

1.2 PLC- γ 1

1.2.1 PLC- γ 1 的分子结构

PLC (phosphoinositide-specific phospholipase) 是一种磷脂酶，激活后的 PLC 能水解 PIP₂，生成第二信使 DAG 和 IP₃，从而传递细胞外的信号，调控细胞的生长、分化、凋亡等生命活动。目前发现 PLC 包含 6 种亚型，分别为 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 、 ζ 和 η 。不同亚型的 PLC 在分子结构上有一些同源区域，包括 PH、EF-hand、X/Y box、C2 domain 等等（如图 1-1 所示）。PH domain 能够连接宿主蛋白最终使 PLC 到达膜表面，X/Y box 具有催化水解活性，C2 domain 能够与 Ca²⁺结合

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库